动 物 学 研 究 1994, 15 (4): 73—78 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

新生期注射纳洛酮和脑啡肽对幼年大鼠分辨学习的影响

邹 伟
(辽宁师范大学生物系 大连 116022)
张世仪
(中国医学科学院基础医学研究所生理室)
王建中[1] 王金玲[1] 杨开海[2] 朱逸仁
(辽宁师范大学生物系)

摘要 本文用 Sprague-Dawley 大鼠为实验动物，从生后一日龄起每日皮下分别注射 1 次纳洛酮(10, 50, 100, 200 μg/100 g b. w)、甲硫氨酸脑啡肽(MEK) (20 μg/100 g b. w)，对照组注射等量的生理盐水。连续注射 14 d，观察 16 日龄幼鼠的吸乳迷津分辨学习(ADL)、30 日龄幼鼠的 Y 迷津明暗分辨学习(BDL)行为与 45 日龄幼鼠前脑蛋白含量的变化。结果表明，50 μg/100 g b. w 纳洛酮能显著抑制幼鼠的 ADL 和 BDL 学习能力，使前脑的蛋白质含量降低。200 μg/100 g b. w 纳洛酮则可明显促进 BDL 学习能力，前脑蛋白含量增加。MEK 抑制 BDL 行为，但对 ADL 无明显的影响。实验结果提示在生后脑发育过程中，阿片肽能影响幼鼠的 ADL 和 BDL 行为，其原因可能和脑内蛋白质含量的变化有关。

关键词 新生期，幼鼠，纳络酮，甲硫脑啡肽，分辨学习 记忆

近年来，阿片肽与学习记忆的关系的研究引起了国内外学者的关注。张世仪等(1987, 1990)发现甲硫氨酸脑啡肽(Met-enkephalin, MEK)可阻抑小鼠操作式条件反射的再现，减弱小鼠被动回避和分辨行为记忆的保持，而纳洛酮(Naloxone, Nal)可翻转脑啡肽的效应，易化或加强记忆过程(Michal, 1991)。众所周知，在个体发育过程中，随着脑的发育和完善，学习和记忆机能也不断发展。大鼠学习与记忆行为的发展与脑发育呈正相关(李德明, 1988)。Dobbing 等(1974)曾指出，大鼠脑发育过程中有一段"生长突发期"，约在生后 10 日龄，在此关键期许多因素可影响脑的发育和机能(Peter, 1993)。有作者指出，阿片肽对大鼠生后脑发育有明显的影响(Zagan, 1983, 1986)。但在脑发育过程中，阿片肽系统是否参与学习和记忆的调控，它与学习行为间有什么关系，目前尚缺乏研究。本实验采用行为训练和生化测定结合的方法，观察了连续给新生期幼鼠注射不同剂量的纳洛酮和 MEK 对幼鼠吸乳迷津分辨学习(Appetitive Discrimination Learning, ADL)、Y 迷津明暗分辨学习(Brightness Discrimination Learning of Y-maze, BDL)与前

[1] 88 级学生 [2] 实验中心

本文 1993 年 6 月 14 日收到，1994 年 3 月 25 日修回

脑蛋白质含量的影响，以探讨生后脑发育期间体内阿片肽系统与幼年动物学习行为发展间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物和药品

以 Spraque-Dawley 纯种大鼠的幼仔为实验动物，出生时体重为 5.5—6.4 g。生后随机分为纳洛酮组($n=36$)、MEK 组($n=12$)和对照组($n=14$)、各组雌雄兼半、纳洛酮组依剂量不同又分 10，50，100，200 μg／100 g b. w 组。MEK 实验组的剂量为 20 μg／100 g b.w。上述动物从生后第 1 天开始，每日分别从颈部皮下注射药物，对照组注射等量的生理盐水，每日 1 次，连续注射 14 天，注射量为 20—50 μl。

纳洛酮与 MEK 均为 Sigma 产品、实验前用生理盐水配制成所需要的浓度。

实验用幼鼠与母鼠同窝饲养，自然光照，室温 18±3℃。

1.2 行为实验

1.2.1 ADL 实验　各组幼鼠均于生后 16 日龄开始进行 ADL 实验。实验前禁食 22—24 h。ADL 的实验装置为自制的有机玻璃 Y 形迷津。此迷津有 3 个臂：起始臂，左臂(L 臂)、右臂(R 臂)。L 臂和 R 臂的顶端分别放置装有苦味酸(0.05%)和速溶奶粉冲剂的小塑料瓶。让幼鼠在迷津中自由活动 5 min，以适应环境。实验开始时，将幼鼠放入起始臂中，观察其活动。如幼鼠在 1 min 内到达 R 臂吸乳，记为正确反应(CR)，奖赏吸乳 5 s。如幼鼠在 1 min 内到达 L 臂吸苦味酸、记为错误反应(ER)、让其吸苦味酸以示惩罚，如幼鼠在 1 min 内原地不动或在左右臂之间徘徊不定，则记为中性反应(MR)。实验中，每只幼鼠训练 20 次、每次间隔 30 s。分别统计 20 次训练的中间 10 次出现的正确反应率(CR%)，中性反应率(MR%)和错误反应率(ER%)，作为衡量学习成绩的指标。

1.2.2 BDL 实验　各组幼鼠均在 30 日龄时开始此项实验。实验在 3 等分辐射式迷宫中进行。迷宫中有 3 个臂，每个臂的顶端都装有 1 盏 15 W 的灯泡。箱底为平行相间的铜棒(间隔 12 cm)。灯亮示安全区，两黑暗臂箱底通电。每只动物适应环境 5 min 后、放入黑暗起始臂中，随机变换安全区的位置。安全区的灯亮 2 s 后，如果动物仍停留在黑暗处或跑向另一黑暗臂内足底即遭到电击(0.7 mA)，直到跑向安全区避免电击，即完成 1 次学习任务。间隔 30 s，开始下次训练。如动物由起始臂直接跑向安全区、即为正确反应。每个实验日，每只幼鼠训练 20 次。连续训练 7 d。以正确反应率达到 90%作为学会的标准、以达到学会标准所需的训练次数作为学习成绩的指标，进行统计学处理。

1.3 脑蛋白样品的制备和测定

待幼鼠行为实验结束后，从各实验组中分别取出 8 只幼鼠(45 日龄)，快速断头处死，取脑精确称重后，加入 10 ml 的 Tris-HC1 缓冲液(pH7.2)研磨匀浆，此匀浆液经离心机离心(4000 r／min、20 min，3 次)后取上清液用 4 层纱布过滤除去脂肪，然后再离心，上清液备用。用紫外吸收法(张龙翔等，1981)测定各组脑提取液中的蛋白质含量、计算单位重量脑组织的蛋白质含量(mg／g)。仪器为日本产岛津-265 型分光光度计(SHIMADZU)。

2 结果

2.1 新生期注射纳洛酮和 MEK 对 16 日龄幼鼠 ADL 行为的影响

如表 1 所示，生后 1—14 d 连续注射不同剂量的纳洛酮和 MEK，对 16 日龄幼鼠的 ADL 行为有不同的影响。纳洛酮的剂量与 ADL 的成绩呈一定的量-效关系。50 μg 组 CR%明显低于对照组($P<0.01$)，MR%明显高于对照组($P<0.05$)。200 μg 组的 CR%高于对照组，ER%低于对照组，但未达到统计学显著差异($P>0.05$)。20 μg MEK 组的 CR%与对照组无明显的差异，而 MR%低于对照组($P<0.05$)。

表 1　纳洛酮和 MEK 对 16 日龄幼鼠 ADL 行为的影响

Tab. 1　Effect of naloxone and MEK on ADL in 16 days old rats ($X \pm SD$)

Group	CR%	MR%	ER%
Saline	60.0±7.5	14 2±6.9	25.7±3 6
Naloxone (/100 g b w)			
10 μg	54.0±6.9	28.0±7.2①	18.0±3.0
50 μg	39.3±6.5②	27.1±5.6①	20.0±4.3
100 μg	52 0±7.7	18 0±9.5	30.0±2 5
200 μg	66 1±5.0	13 8±6.5	20.1±8 8
MEK 20 μg	67 1±8.5	6.2±4.5①	26.7±5 4

注：① $P<0.05$　　② $P<0.01$

2.2 新生期注射纳洛酮与 MEK 对 30 日龄幼鼠 BDL 行为的影响(图 1)

由图 1 可见对照组的幼鼠从 30 日龄开始进行 BDL 行为测试时，达到学会标准所需的训练次数(NT)是 47.3±4.1，而新生期注射 NAL 和 MEK 后，达标所需的训练次数有明显的变化。其中纳洛酮 10 μg 组为 50.0±4.3 次、50 μg 组为 85.0±4.6 次($P<0.01$)，

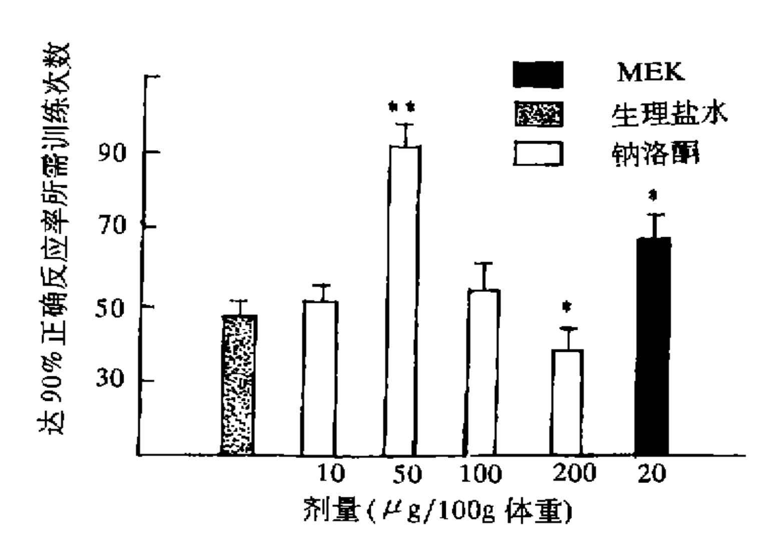


图 1　纳洛酮和 MEK 对 30 日龄幼鼠 BDL 行为的影响

Fig. 1　Effect of naloxone and MEK on DKL in 30 days old rats

** $P<0.01$　　* $P<0.05$

100 μg 组为 51.4 ± 7.5 次，200 μg 组 38.9 ± 4.73 次，后者与对照组相比有显著差异($P<0.05$)。可见，较高剂量的纳洛酮促进 BDL 行为的发展，较低剂量的纳洛酮抑制 BDL 行为的发展。20 μg MEK 组幼鼠达标所需的训练次数为 63.3 ± 8.8 次，明显高于对照组($P<0.05$)。

2.3 新生期注射纳洛酮和 MEK 对幼鼠脑重和前脑蛋白含量的影响(图 2)

如图 2 所示，新生期连续注射纳洛酮和 MEK 后，于 45 日龄称脑重，测全脑蛋白质含量的变化。结果发现，纳洛酮 200 μg 组的幼鼠其脑重和蛋白质的含量分别高于对照组 8.9%和 12.9%，有显著性的差异($P<0.05$)。50 μg 组幼鼠脑蛋白含量明显低于对照组($P<0.01$)，但脑重的变化不明显。其它剂量的纳洛酮组和 MEK 组幼鼠脑重及脑蛋白含量与对照组相比均无显著性差异。

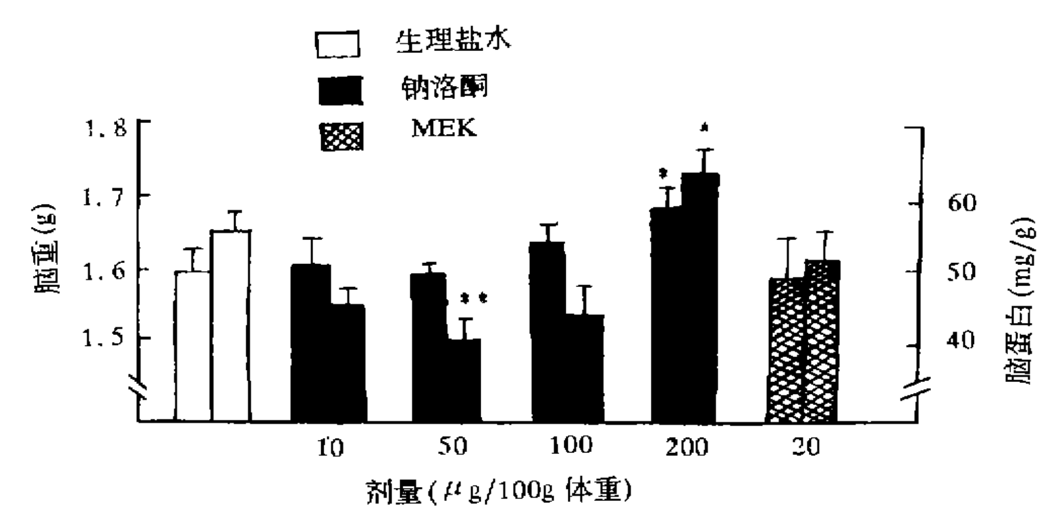


图 2 纳洛酮和 MEK 对幼鼠脑重和全脑蛋白含量影响

Fig. 2 Effect of naloxone and MEK on the brain meight and the concentration of brain protine in the 45 days old rats

** $P<0.01$ * $P<0.05$

3 讨论

许多作者报道了脑内阿片肽影响成年动物的学习与记忆(张世仪等，1987，1992；Michael，1991)。Sandra 等(1985)在工作中发现，动物在胚胎发育期，脑内已具有阿片肽和阿片受体。这提示动物脑内的阿片系统与个体发育过程中学习记忆的发展可能有关。

我们在实验中观察到出生后幼鼠连续 14 日龄注射阿片受体的阻断剂纳洛酮和甲硫氨酸脑啡肽(MEK)后，对幼鼠的 ADL 和 BDL 行为及脑内蛋白质的含量有不同的影响。50 μg 的纳洛酮降低 ADL 的正确反应率，而使 BDL 达标所需的训练次数明显多于对照组，说明 50 μg 纳洛酮对幼鼠的学习行为有抑制效应。200 μg 的纳洛酮则表现相反，ADL 的正确反应率高于对照组，BDL 达标所需的训练次数明显少于对照组，说明 200 μg 纳洛酮对幼鼠学习行为有促进效应。

Zagan(1983、1986)观察到幼鼠在断乳前连续按受高剂量的阿片阻断剂纳洛酮注射可促使大脑皮质、海马与小脑某些区域神经元数量的增加和体积的增大，感觉性运动机能的发展加速，而低剂量则相反。Vertes(1982)也发现，给 11 日龄幼鼠腹腔注射 200 μg／100 g b. w 纳洛酮后，脑内 DNA 合成速率增加，而注射 20 μg／100gb. w 的 MEK 则表现相反。这些结果与我们的实验结果相符合。生后连续注射高剂量的纳洛酮后，幼鼠脑的重量与脑内蛋白质含量均高于对照组。低剂量 50 μg 纳洛酮虽然脑重无明显的变化，但蛋白质含量减少。而 10 μg 纳洛酮对幼鼠 ADL 和 BDL 均无影响，脑内蛋白质含量也无改变。这些结果提示，幼鼠学习行为的变化与脑内蛋白质含量的变化有密切的关系，阿片系统在脑发育期间可能通过影响蛋白合成而影响幼鼠学习能力的发展。

此外，在我们的实验中，20 μg 的 MEK 对幼鼠 ADL 的正确反应率无明显影响，而 BDL 的成绩却显著下降，说明外周注射脑啡肽可影响幼年动物的学习和记忆，但因学习模式不同而有所不同。MEK 是否直接通过体内阿片受体影响幼鼠的 BDL 行为，其机制与内源性阿片肽作用有何异同，尚需进一步探讨。

参 考 文 献

张世仪，齐慧新，王　玢，1990. 脑啡肽阻抑大鼠操作式条件反射的再现. 科学通报，**35**(10)：781—783.

张世仪，McGaugh J L，1987. 脑啡肽与记忆巩固的调制. 中国医学科学院学报，**9**(1)：60—64

张龙翔等编著，1981 生化实验方法和技术. 北京：高等教育出版社.

李德明，1988. 婴鼠 Y 迷津吸乳分辨学习行为的发展与脑生长和旋转行为关系的实验研究. 心理学报，4：411—414.

Dobbing J，Smart J L，1974. Vulnerability of developing brain and behavior. IBID，**30**：164-168.

Michael W D，1991. The role of interactions between the cholinergic system and neuromodulatory system in learning and memery Synapse，7：151-168.

Peter J *et al*，1993. Prenatal malnutrition and developments of the brain. Neurosic and Biobehav Rev，**17**(1)：91-128

Sandra E L *et al*，1985. Postnatal development of opioid systems in rat brain. Neuropeptides，**5**：496-472.

Vertes Z *et al*，1982. Effect of naloxone and D-Met-Pro-enkephalinamide treatment on the DNA synthesis in the developin rat brain *Life Sci.*，**31**：119-126.

Zagan I S，Mclaughlin P J，1983. Increased brain size and cellular content in infant rats treated with an opiate antagonist. *Science*，**221**：1179-1180.

Zagan I S，Mclaughlin P J，1986. Opiod antagnist-induced modulation of cerebral and hippocampl development：histological and morphometric studies. *Dev Brain Res*，**28**：233-241.

POSTNATAL EXPOSURE NALOXONE AND MET–ENKEPHALIN AFFECTS THE DISCRIMINATION LEARNING IN INFANT RATS

Zou Wei Zhang Shiyi* Wang Jianzhong Wang Jinling
Yang Kaihai Zhu Yiren

(Department of Biology, Liaoning Normal University, Dalian 116022)

(* *Institute of Basic Medical Sciences, CAMS*)

Abstract

Infant Spraque–Dawley rats were divided into several groups and received daily injection of saline, naloxone (10, 50, 100 or 200 μg / 100 g b. w) or Met–enkephalin (MEK 20 μg / 100 g b.w) respectively from postnatal days 1–14. They were trained in the appetitive discrimination learning (ADL) at the age of 16 days, then in the bright discrimination learning of Y–maze (BDL) at 30 days of age. On days 45, the content of brain protein of the rats was examined. Results showed that the dose of 50 μg / 100 g b. w of naloxone significantly inhibited learning behavior in ADL and BDL and lowerd the content of brain protein of the pups. The dose of 200 μg / 100 g b. w. of naloxone had the opposite effects. No singnificant effects were seen for the other doses of naloxone. Whereas, MEK inhibited learning of the infant rats in BDL. Results suggest that the endogenous opioid system may influence some behavior during postnatal brain development of infant rats.

Key words Naloxone, Met–enkephalin, Infant rats, Discrimination learning